

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

JC997 U.S. PTO
09/935757
08/24/01

In re PATENT APPLICATION of
Inventor(s): Möckel et al.

Appln. No.:	
Series Code	↑ Serial No.

Group Art Unit: to be assigned

Filed: August 24, 2001 (herewith)

Examiner: to be assigned

Title: Sequences which code for the sigE gene

Atty. Dkt. P 282664	000445 BT
M#	Client R f

Date: August 24, 2001

**SUBMISSION OF PRIORITY
DOCUMENT IN ACCORDANCE
WITH THE REQUIREMENTS OF RULE 55**

Hon. Asst Commissioner of Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

Please accept the enclosed certified copy(ies) of the respective foreign application(s) listed below for which benefit under 35 U.S.C. 119/365 has been previously claimed in the subject application and if not is hereby claimed.

<u>Application No.</u>	<u>Country of Origin</u>	<u>Filed</u>
DE 100 43 336.7	GERMANY	September 2, 2000

Respectfully submitted,

Pillsbury Winthrop LLP
Intellectual Property Group

1600 Tysons Boulevard

McLean, VA 22102
Tel: (703) 905-2000
Atty/Sec: MAS/AMX

By Atty: Michael A. Sanzo Reg. No. 36912

Sig: Michael A. Sanzo Fax: (703) 905-2500
Tel: (703) 905-2173

Neue für das sigE-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das sigE-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren
5 unter Verwendung von Bakterien, in denen das sigE-Gen verstärkt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie
10 und ganz besonders in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der
15 Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die
20 Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser
25 Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und Aminosäuren produzieren.

30 Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure produzierenden Stämmen von Corynebacterium

eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

Aufgabe der Erfindung

- 5 Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

- Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt,
10 sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan
15 und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist Lysin.

Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das sigE-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 20 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%
25 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
30 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Sigma-Faktors E aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine
5 replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des
10 genetischen Kodes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

15 Weitere Gegenstände sind

ein replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA, enthaltend die Nukleotidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid
20 kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält;

ein Vektor, enthaltend das erfindungsgemäße Polynukleotid, insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, und

coryneforme Bakterien, die den Vektor enthalten oder in
25 denen das sigE-Gen verstärkt ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums,

die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

- 5 Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für den Sigma-Faktor E kodieren, oder um solche
- 10 Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der des sigE-Gens aufweisen.

- Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren
- 15 Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für den Sigma-Faktor E kodieren.

- Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide, enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz
- 20 besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

- 25 „Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

- Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein
- 30 Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem

Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus hergestellten Fragments.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität des Sigma-Faktors E und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das sigE-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke,

Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

- 10 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032
- Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806
- Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870
- Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539
- Corynebacterium melassecola* ATCC17965
- 15 *Brevibacterium flavum* ATCC14067
- Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 und
- Brevibacterium divaricatum* ATCC14020

und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten bzw. Stämme.

- 20 Den Erfindern gelang es, das neue, für das Enzym Sigma-Faktor E kodierende sigE-Gen von *C. glutamicum* zu isolieren.

- Zur Isolierung des sigE-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses
- 25 Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank
 - 30 ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et

al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 5 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* 10 ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pH79 (Hohn und Collins, Gene 11, 291-298 (1980)).

Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 15 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche *E. coli* Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 α mc r , der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) 20 beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 25 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von 30 Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Auf diese Weise wurde die neue für das Gen *sigE* kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID No.

1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die
5 sich ergebende Aminosäuresequenz des sigE-Genproduktes dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind
10 DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als
15 „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar
20 stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology
25 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1
30 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben
35 typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 100 43 336.7

Anmeldetag: 2. September 2000

Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE

Erstanmelder: Degussa-Hüls Aktiengesellschaft,
Frankfurt am Main/DE

Bezeichnung: Neue für das sigE-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

IPC: C 12 N, C 12 Q, C 07 H

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 22. Juni 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschriffe durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschriffen durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50 - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50 - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von 50 auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der

eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Bei der Arbeit an der vorliegenden Erfindung konnte festgestellt werden, daß coryneforme Bakterien nach Überexpression des sigE-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren produzieren.

Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen Aminosäure-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Zur Verstärkung wurde das erfindungsgemäße sigE-Gen beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden überexprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren wie z.B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren wie z.B. solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur

Duplikation bzw. Amplifikation des *hom-thrB*-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum*

5 replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA),

10 pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-A 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder

15 pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994))

20 beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben.

25 Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, neben dem *sigE*-Gen eines oder mehrere

30 Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphat-Zyklus, des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Aminosäuren zusätzlich zur Verstärkung des sigE-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 • das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA (EP-B 0 197 335),
- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 10 • das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),
- 15 • das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (DE-A-198 31 609),
- das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)),
- 20 • das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (Accession No.P26512),
- das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE (DE-A-195 48 222),
- 25 • das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom (EP-A 0131171),
- das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen ilvA (Möckel et al., Journal of Bacteriology (1992) 8065-8072)) oder das für eine "feed back resistente" Threonin-

Dehydratase kodierende Allel *ilvA*(Fbr) (Möckel et al., (1994) Molecular Microbiology 13: 833-842),

- das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierenden Gen *ilvBN* (EP-B 0356739),
 - 5 • das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen *ilvD* (Sahm und Eggeling (1999) Applied and Environmental Microbiology 65: 1973-1979),
 - das für das Zwa1-Protein kodierende Gen *zwa1* (DE: 19959328.0, DSM 13115)
- 10 verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des *sigE*-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 15 • das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen *pck* (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen *pgi* (US 09/396,478; DSM 12969),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB* (DE: 1995 1975.7; DSM 13114),
- 20 • das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2* (DE: 19959327.2, DSM 13113)

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

- Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren vorteilhaft sein, neben der Überexpression des *sigE*-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: 25 "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Ionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei

Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren.

- 5 Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al.

- 10 (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) durchgeführt. Methoden zur Transformation von *Escherichia coli* sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

- 15 Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

Beispiel 1

- 20 Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

- Chromosomale DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma
- 25
30

Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) 5 gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.

Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. 10 Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit 15 Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen 20 in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar 25 (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des sigE-Gens

30 Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg,

Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

- 10 Die DNA des Sequenziervektors pZero-1, bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01), wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
- 15 Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit
- 20 T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.

- Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems
- 30 (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet.
- 35

Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377"

- 5 Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die

- 10 Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurde mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

- 15 Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 651 Basenpaaren, welches als sigE-Gen bezeichnet wurde. Das sigE-Gen kodiert für ein Protein von 216 Aminosäuren.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls AG

5 <120> Neue für das sigE-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

<130> aaaaaa BT

<140>

10 <141>

<160> 2

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1330

<212> DNA

20 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (302)..(949)

25 <223> sigE-Gen

<400> 1

accagtggag ccgttgccat tgggtggtggc agccaaagtg gttagcagct ggccagtcac 60

30 ttcacccggg gcggggagac cgaactcggc ggcgctcttca cgagcgcgcg ctacagcagc 120

gtcgggtttca gtagtggact cgacataagt gcgaagatac tcgaaggcgt tactcacgcg 180

ttatagtcta gagcgcagcag gcgagatgtg aagtacctac acgcattaag tgcaaatgaa 240

35 ttcacaattg ccagaagatg cacaggatgt aatctagatt tcccaagtgc agtggggcaa 300

a atg act tat atg aaa aag aag tcc cga gat gac gca ccc gtc gta atc 349

Met Thr Tyr Met Lys Lys Lys Ser Arg Asp Asp Ala Pro Val Val Ile

1

5

10

15

40

gaa acc gtt caa gca gaa cat gct gaa gaa ctc acg ggc act gca gca 397

Glu Thr Val Gln Ala Glu His Ala Glu Glu Leu Thr Gly Thr Ala Ala

20

25

30

45 ttc gat gct gga cag gca gac atg cca aca tgg ggc gag cta gtc gca 445

Phe Asp Ala Gly Gln Ala Asp Met Pro Thr Trp Gly Glu Leu Val Ala

35

40

45

50 gaa cat gca gat agc gtt tac cgc ctc gcg tac cgt ctt tcc ggc aac 493

Glu His Ala Asp Ser Val Tyr Arg Leu Ala Tyr Arg Leu Ser Gly Asn

50

55

60

cag cac gat gct gaa gac ctg acc caa gaa aca ttc atg cgt gtc ttc 541

Gln His Asp Ala Glu Asp Leu Thr Gln Glu Thr Phe Met Arg Val Phe

55

65

70

75

80

cgc tcg ttg aag agc tac cag cca ggc acc ttt gag ggc tgg ctg cac 589

Arg Ser Leu Lys Ser Tyr Gln Pro Gly Thr Phe Glu Gly Trp Leu His

85

90

95

5 cgc atc acc acc aac ttg ttc ctt gat atg gtt cgc cac cgc ggc aag 637
 Arg Ile Thr Thr Asn Leu Phe Leu Asp Met Val Arg His Arg Gly Lys
 100 105 110
 atc cgc atg gag gcg ctg cct gaa gat tat gag cgc gtt ccg ggc aat 685
 Ile Arg Met Glu Ala Leu Pro Glu Asp Tyr Glu Arg Val Pro Gly Asn
 115 120 125
 10 gac atc acc cca gag cag gca tac acc gaa gct aac ctt gac cca gct 733
 Asp Ile Thr Pro Glu Gln Ala Tyr Thr Glu Ala Asn Leu Asp Pro Ala
 130 135 140
 15 ctg cag gca gcc ctc gat gag ttg agc cca gac ttc cgc gtg gca gtg 781
 Leu Gln Ala Ala Leu Asp Glu Leu Ser Pro Asp Phe Arg Val Ala Val
 145 150 155 160
 20 atc ctc tgt gat gtt gtt ggt atg agc tat gac gaa atc gca gag acc 829
 Ile Leu Cys Asp Val Val Gly Met Ser Tyr Asp Glu Ile Ala Glu Thr
 165 170 175
 ctc gga gtg aaa atg ggt acc gtg cgt tcc cgt att cac cgt gga cgc 877
 Leu Gly Val Lys Met Gly Thr Val Arg Ser Arg Ile His Arg Gly Arg
 180 185 190
 25 agc cag ctt cgt gca agt ttg gaa gct gca gca atg acc agc gag gaa 925
 Ser Gln Leu Arg Ala Ser Leu Glu Ala Ala Ala Met Thr Ser Glu Glu
 195 200 205
 30 gtt tct ttg ttg gtt cca acc cac taaagttggt gtgttttctg acacgacaaa 979
 Val Ser Leu Leu Val Pro Thr His
 210 215
 35 cgcaaagtgc gtgtcatttt tgcagctcag tgcattattt tggggttcgt ggtgcggaca 1039
 ggggaacttat cacaggcgac atccgttttg agtagtaggt atcttgata agaagttacc 1099
 cacatccttg aaagtcgaga cacaggaggt catcggaaga tatgttcaat tccgacacca 1159
 40 ccgcgaatct ccaagctaaa agtcgagatc gtgcaggatc taaagcaaag cgcagcaggc 1219
 caagttttga ttcagtagcg cgggatgttt tggatgttcg aacaaaaaca gcacaagtta 1279
 45 aaaacaaggc taaagagttt tcctctgttg atcacctttc agcagacgcc g 1330
 <210> 2
 <211> 216
 <212> PRT
 50 <213> Corynebacterium glutamicum
 <400> 2
 Met Thr Tyr Met Lys Lys Lys Ser Arg Asp Asp Ala Pro Val Val Ile
 1 5 10 15
 55 Glu Thr Val Gln Ala Glu His Ala Glu Glu Leu Thr Gly Thr Ala Ala
 20 25 30
 Phe Asp Ala Gly Gln Ala Asp Met Pro Thr Trp Gly Glu Leu Val Ala

	35	40	45
5	Glu His Ala Asp Ser Val Tyr Arg Leu Ala Tyr Arg Leu Ser Gly Asn 50 55 60		
	Gln His Asp Ala Glu Asp Leu Thr Gln Glu Thr Phe Met Arg Val Phe 65 70 75 80		
10	Arg Ser Leu Lys Ser Tyr Gln Pro Gly Thr Phe Glu Gly Trp Leu His 85 90 95		
	Arg Ile Thr Thr Asn Leu Phe Leu Asp Met Val Arg His Arg Gly Lys 100 105 110		
15	Ile Arg Met Glu Ala Leu Pro Glu Asp Tyr Glu Arg Val Pro Gly Asn 115 120 125		
20	Asp Ile Thr Pro Glu Gln Ala Tyr Thr Glu Ala Asn Leu Asp Pro Ala 130 135 140		
	Leu Gln Ala Ala Leu Asp Glu Leu Ser Pro Asp Phe Arg Val Ala Val 145 150 155 160		
25	Ile Leu Cys Asp Val Val Gly Met Ser Tyr Asp Glu Ile Ala Glu Thr 165 170 175		
	Leu Gly Val Lys Met Gly Thr Val Arg Ser Arg Ile His Arg Gly Arg 180 185 190		
30	Ser Gln Leu Arg Ala Ser Leu Glu Ala Ala Ala Met Thr Ser Glu Glu 195 200 205		
35	Val Ser Leu Leu Val Pro Thr His 210 215		
40			

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien,
enthaltend eine für das sigE-Gen kodierende
5 Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist
mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid
kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2
enthält,
 - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das
eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%
identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID
No. 2,
 - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den
15 Polynukleotiden von a) oder b), und
 - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
aufeinanderfolgende Nukleotide der
Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),
- wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Sigma-
20 Faktors E aufweist.
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid
eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt
rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid
25 eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die
Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
 - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz
(i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des
genetischen Kodes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz
5 (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert,
und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß die Hybridisierung von
10 Sequenz (iii) unter einer Stringenz entsprechend
höchstens 2x SSC durchgeführt wird.
7. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 2, die für ein
Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2
dargestellte Aminosäuresequenz enthält.
- 15 8. Coryneforme Bakterien, in denen das sigE-Gen verstärkt,
insbesondere überexprimiert wird.
9. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-
Aminosäuren, insbesondere Lysin,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
20 daß man folgende Schritte durchführt:
- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure
produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man
zumindest das sigE-Gen oder dafür kodierende
Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere
25 überexprimiert;
- b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium
oder in den Zellen der Bakterien, und
- c) Isolieren der L-Aminosäure.
10. Verfahren gemäß Anspruch 9,
30 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,

daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.

- 5 11. Verfahren gemäß Anspruch 9,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man Bakterien einsetzt, in denen die
Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet
sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure
verringern.
- 10 12. Verfahren gemäß Anspruch 9,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man einen mit einem Plasmidvektor transformierten
Stamm einsetzt, und der Plasmidvektor die für das sigE-
Gen kodierende Nukleotidsequenz trägt.
- 15 13. Verfahren gemäß Anspruch 9,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man die Expression des (der) Polynukleotides (e),
das (die) für das sigE-Gen kodiert (kodieren)
verstärkt, insbesondere überexprimiert.
- 20 14. Verfahren gemäß Anspruch 9,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man die regulatorischen Eigenschaften des
Polypeptids (Enzymprotein) erhöht, für das das
Polynukleotid sigE kodiert.
- 25 15. Verfahren gemäß Anspruch 9,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme
Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig
eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 30 15.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase
kodierende Gen dapA,

- 15.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen gap,
- 15.3 das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi,
- 5 15.4 das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk,
- 15.5 das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen zwf,
- 10 15.6 das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc,
- 15.7 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo,
- 15.8 das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC,
- 15 15.9 das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE,
- 15.10 das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom,
- 20 15.11 das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen ilvA oder das für eine feed back resistente Threonin-Dehydratase kodierende Allel ilvA(Fbr),
- 15.12 das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierende Gen ilvBN,
- 25 15.13 das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen ilvD,
- 15.14 das für das Zwa1-Protein kodierende Gen zwal
- verstärkt bzw. überexprimiert.

16. Verfahren gemäß Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme
Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig
eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

16.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
kodierende Gen pck,

16.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase
kodierende Gen pgi,

10 16.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB

16.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2
abschwächt.

17. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der
ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.

15 18. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden
Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Mikroorganismen der Gattung Corynebacterium
einsetzt.

20 19. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um
Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene
zu isolieren, die für den Sigma-Faktor E kodieren oder
eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des sigE-Gens
aufweisen,
25 dadurch gekennzeichnet,
daß man das Polynukleotid, enthaltend die
Polynukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen 1, 2, 3
oder 4 als Hybridisierungs sonden einsetzt.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%
10 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das sigE-Gen verstärkt vorliegt, und die
20 Verwendung von Polynukleotiden, die die erfindungsgemäßen Sequenzen enthalten, als Hybridisierungssonden.